

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

FITZNER, Uwe  
Lintorfer Strasse 10  
D-40878 Ratingen  
ALLEMAGNE

|   |  |
|---|--|
| <b>Date of mailing</b> (day/month/year)<br>12 October 2000 (12.10.00) | <b>IMPORTANT NOTIFICATION</b>  |
| <b>Applicant's or agent's file reference</b><br>HOF9801PCT            |  |
| <b>International application No.</b><br>PCT/EP00/01497                | <b>International filing date</b> (day/month/year)<br>24 February 2000 (24.02.00) |

|  |                                   |                                 |
|--|-----------------------------------|---------------------------------|
| <b>1. The following indications appeared on record concerning:</b><br><input checked="" type="checkbox"/> the applicant <input checked="" type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative   |                                   |                                 |
| <b>Name and Address</b><br>HOFFMANN, Michael<br>Am Widtmanschacht 26<br>D-52224 Stolberg<br>Germany  | <b>State of Nationality</b><br>DE | <b>State of Residence</b><br>DE |
|  | <b>Telephone No.</b>              |                                 |
|  | <b>Facsimile No.</b>              |                                 |
|  | <b>Teleprinter No.</b>            |                                 |
| <b>2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:</b><br><input type="checkbox"/> the person <input type="checkbox"/> the name <input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence  |                                   |                                 |
| <b>Name and Address</b><br>HOFFMANN, Michael<br>Bergrather Strasse 13<br>D-52249 Eschweiler<br>Germany   | <b>State of Nationality</b><br>DE | <b>State of Residence</b><br>DE |
|  | <b>Telephone No.</b>              |                                 |
|  | <b>Facsimile No.</b>              |                                 |
|  | <b>Teleprinter No.</b>            |                                 |
| <b>3. Further observations, if necessary:</b><br><b>This form cancels and replaces form IB/306 dated 08 June 2000, which erroneously indicated that applicant/inventor HORRES, Roland, had changed address.</b>  |                                   |                                 |
| <b>4. A copy of this notification has been sent to:</b><br><input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned<br><input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned<br><input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority <input type="checkbox"/> other: |                                   |                                 |

|  |  |
|--|--|
| <b>The International Bureau of WIPO</b><br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland<br>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | <b>Authorized officer</b><br>Ingrid Aulich<br>Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |
|--|--|

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
 US Department of Commerce  
 United States Patent and Trademark  
 Office, PCT  
 2011 South Clark Place Room  
 CP2/5C24  
 Arlington, VA 22202  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
 in its capacity as elected Office

|  |   |
|--|---|
| <b>Date of mailing</b> (day/month/year)<br>06 December 2000 (06.12.00)           |   |
| <b>International application No.</b><br>PCT/EP00/01479                           | <b>Applicant's or agent's file reference</b><br>LE A 33 417-WO Sw |
| <b>International filing date</b> (day/month/year)<br>23 February 2000 (23.02.00) | <b>Priority date</b> (day/month/year)<br>08 March 1999 (08.03.99) |
| <b>Applicant</b><br>BERNETH, Horst et al   |   |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:19 September 2000 (19.09.00)☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

|  |  |
|--|--|
| <b>The International Bureau of WIPO</b><br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland<br>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | <b>Authorized officer</b><br><br>Pascal Piriou<br>Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |
|--|--|

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## P. ENT COOPERATION TREA

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

|  |  |
|--|--|
| <b>Date of mailing</b> (day/month/year)<br>02 October 2000 (02.10.00)            |  |
| <b>International application No.</b><br>PCT/EP00/01497                           | <b>Applicant's or agent's file reference</b><br>HOF9801PCT           |
| <b>International filing date</b> (day/month/year)<br>24 February 2000 (24.02.00) | <b>Priority date</b> (day/month/year)<br>26 February 1999 (26.02.99) |
| <b>Applicant</b><br>HOFFMANN, Michael et al                                      |  |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
25 August 2000 (25.08.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:  
\_\_\_\_\_

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

|  |   |
|--|---|
| <b>The International Bureau of WIPO</b><br>34, chemin des Colombettes<br>1211 Geneva 20, Switzerland<br>Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | <b>Authorized officer</b><br>S. Mafla<br>Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |
|--|---|

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No

PCT/EP 00/01497

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 A61L33/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X          | US 4 350 629 A (FORBES MARTIN J ET AL)<br>21 September 1982 (1982-09-21)<br>the whole document  | 1-14                  |
| A          | DE 36 39 561 A (KELLER JUN RUPRECHT DR DR;<br>BAUMANN HANNO (DE))<br>1 June 1988 (1988-06-01)<br>cited in the application<br>column 3, line 46 -column 4, line 62<br>examples 2-8 | 1,2,4,8,<br>9,13,14   |
| A          | US 5 643 712 A (BRASILE LAUREN)<br>1 July 1997 (1997-07-01)<br>column 3, line 65 -column 4, line 30<br>-/-  | 1,2,9,14              |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 October 2000

Date of mailing of the international search report

02/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Heck, G

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/01497

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                    | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A          | <p>WO 93 01843 A (UNIV LEICESTER)<br/> 4 February 1993 (1993-02-04)<br/> cited in the application<br/> claims 1,2</p> | <p>1,2,9,14</p>       |



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Int'l Application No

PCT/EP 00/01497

| Patent document<br>cited in search report |   | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) |           | Publication<br>date |
|---|---|---------------------|----------------------------|-----------|---------------------|
| US 4350629                                | A | 21-09-1982          | CA                         | 1197189 A | 26-11-1985          |
| DE 3639561                                | A | 01-06-1988          | AT                         | 81594 T   | 15-11-1992          |
|   |   |                     | AU                         | 617655 B  | 05-12-1991          |
|   |   |                     | AU                         | 8239387 A | 16-06-1988          |
|   |   |                     | WO                         | 8803813 A | 02-06-1988          |
|   |   |                     | EP                         | 0333730 A | 27-09-1989          |
|   |   |                     | JP                         | 2565363 B | 18-12-1996          |
|   |   |                     | JP                         | 2501268 T | 10-05-1990          |
|   |   |                     | US                         | 5071973 A | 10-12-1991          |
| US 5643712                                | A | 01-07-1997          | AU                         | 2517395 A | 18-12-1995          |
|   |   |                     | WO                         | 9531944 A | 30-11-1995          |
| WO 9301843                                | A | 04-02-1993          | AU                         | 2361792 A | 23-02-1993          |



1

2

3

4

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AM GEBIET DES PATENTWESENS**

# PCT

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

|   |   |
|---|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts<br><b>HOF9801PCT</b>      | <b>WEITERES<br/>VORGEHEN</b><br>siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen<br>Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit<br>zutreffend, nachstehender Punkt 5 |
| Internationales Aktenzeichen<br><b>PCT/EP 00/ 01497</b>           | Internationales Anmeldedatum<br>(Tag/Monat/Jahr)<br><b>24/02/2000</b>   |
| (Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)<br><b>26/02/1999</b> |   |
| Anmelder<br><br><b>HOFFMANN, Michael</b>                          |   |

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

**1. Grundlage des Berichts**

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

- ☐ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.  
☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.  
☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.  
☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.  
☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.  
☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

**4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung**

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.  
☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

**5. Hinsichtlich der Zusammenfassung**

- ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.  
☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

**6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. --**

- ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen ☐ keine der Abb.  
☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.  
☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
**IPK 7 A61L33/18**

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RESEARCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

**IPK 7 A61L**

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**EPO-Internal, WPI Data, PAJ**
**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile  | Betr. Anspruch Nr.  |
|------------|---|---------------------|
| X          | US 4 350 629 A (FORBES MARTIN J ET AL)<br>21. September 1982 (1982-09-21)<br>das ganze Dokument   | 1-14                |
| A          | DE 36 39 561 A (KELLER JUN RUPRECHT DR DR;<br>BAUMANN HANNO (DE))<br>1. Juni 1988 (1988-06-01)<br>in der Anmeldung erwähnt<br>Spalte 3, Zeile 46 -Spalte 4, Zeile 62<br>Beispiele 2-8 | 1,2,4,8,<br>9,13,14 |
| A          | US 5 643 712 A (BRASILE LAUREN)<br>1. Juli 1997 (1997-07-01)<br>Spalte 3, Zeile 65 -Spalte 4, Zeile 30<br>-/-   | 1,2,9,14            |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"†" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"x" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. Oktober 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

02/11/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5618 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Heck, G

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile                       | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| A          | <p>WO 93 01843 A (UNIV LEICESTER)<br/> 4. Februar 1993 (1993-02-04)<br/> in der Anmeldung erwähnt<br/> Ansprüche 1,2</p> | 1,2,9,14           |

# INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inter. Aktenzeichen

PCT/EP 00/01497

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument |   | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie |           | Datum der<br>Veröffentlichung |
|--|---|-------------------------------|-----------------------------------|-----------|-------------------------------|
| US 4350629   | A | 21-09-1982                    | CA                                | 1197189 A | 26-11-1985                    |
| DE 3639561   | A | 01-06-1988                    | AT                                | 81594 T   | 15-11-1992                    |
|  |   |                               | AU                                | 617655 B  | 05-12-1991                    |
|  |   |                               | AU                                | 8239387 A | 16-06-1988                    |
|  |   |                               | WO                                | 8803813 A | 02-06-1988                    |
|  |   |                               | EP                                | 0333730 A | 27-09-1989                    |
|  |   |                               | JP                                | 2565363 B | 18-12-1996                    |
|  |   |                               | JP                                | 2501268 T | 10-05-1990                    |
|  |   |                               | US                                | 5071973 A | 10-12-1991                    |
| US 5643712   | A | 01-07-1997                    | AU                                | 2517395 A | 18-12-1995                    |
|  |   |                               | WO                                | 9531944 A | 30-11-1995                    |
| WO 9301843   | A | 04-02-1993                    | AU                                | 2361792 A | 23-02-1993                    |



1

2



# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

REC'D 31 MAY 2001

WIPO PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)


|   |  |   |
|---|--|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts<br><b>HEM-P10688-WO</b>                                     | <b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416) |   |
| Internationales Aktenzeichen<br><b>PCT/EP00/01497</b>   | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)<br><b>24/02/2000</b>   | Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)<br><b>26/02/1999</b> |
| Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK<br><b>A61L33/00</b> |  |   |
| Anmelder<br><b>HOFFMANN, Michael et al.</b>   |  |   |

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 7 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
  - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

|  |   |
|--|---|
| Datum der Einreichung des Antrags<br><b>25/08/2000</b>   | Datum der Fertigstellung dieses Berichts<br><b>29.05.2001</b>                             |
| Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:<br><br> <b>Europäisches Patentamt</b><br><b>D-80298 München</b><br><b>Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d</b><br><b>Fax: +49 89 2399 - 4465</b> | Bevollmächtigter Bediensteter<br><br><b>Ludwig, G</b><br><b>Tel. Nr. +49 89 2399 8698</b> |



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**I. Grundlage des Berichts**

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):  
**Beschreibung, Seiten:**

1-21                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-14                      ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,              Seiten:
- ☐ Ansprüche,                Nr.:
- ☐ Zeichnungen,              Blatt:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

1. Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 14.

**Begründung:**

- ☒ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 14 beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):  
**siehe Beiblatt**
- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.
2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:
- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
- ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

1. Feststellung

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/01497

|                                |                 |                              |
|--------------------------------|-----------------|------------------------------|
| Neuheit (N)                    | Ja: Ansprüche   | 7-8, 11-13                   |
|                                | Nein: Ansprüche | 1-6, 9-10, 14                |
| Erfinderische Tätigkeit (ET)   | Ja: Ansprüche   |                              |
|                                | Nein: Ansprüche | 1-14                         |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (GA) | Ja: Ansprüche   | 1-13 (14 - siehe Beiblätter) |
|                                | Nein: Ansprüche |                              |

## 2. Unterlagen und Erklärungen siehe Beiblatt

### VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:  
siehe Beiblatt

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Es wird auf das folgende Dokument verwiesen:

D1: US-A-4 350 629

Punkt V:

1. Wegen einer Unklarheit im Anspruch 1 ("..Bestandteile der äußeren Schicht .." anstatt "..Bestandteile **aus** der äußeren Schicht .." -siehe dazu die entsprechende Formulierung in Anspruch 4) ergibt sich bei den Ansprüchen 1-6, 9-10 und 14 ein Mangel an Neuheit gegenüber Dokument D1:

Dokument D1 beschreibt hämokompatible Oberflächen nach Art der Anmeldung enthaltend Glucosaminoglykan (GAG) wie etwa Chondroitinsulfat, Keratansulfat sowie ferner Kollagen (Anspruch 5, Spalte 2, Zeilen 6-11, 34-51, Spalte 4, Zeilen 15-18).

2. In den von Anspruch 1 abhängigen Ansprüchen 7-8 und 11-13 kann auf der Basis des vorliegenden, unklaren Anspruchs 1 nichts Erfinderisches erkannt werden.
3. Ein klagestellter Anspruch 1, der die essentiellen technischen Merkmale von Anspruch 4 enthält könnte im Prinzip als neu und erfinderisch gegenüber Dokument D1 gelten.

Der Anmelder hat ausgeführt, daß Glykosaminoglykane polydispers sind, d.h. je nach Herkunft sehr unterschiedliche Eigenschaften aufweisen können (Leberheparansulfat wirkt stark gerinnungsaktivierend, Erythrozytenoberflächenheparansulfat ist dagegen athrombogen).

Das in Dokument D1 verwendete Glykosaminoglykan kann beliebigen Ursprungs sein während anmeldungsgemäß dafür nur Blut- oder Mesothelzellen herangezogen werden, welche athrombogen sind.

Dokument D1 benutzt ein dreidimensionales Kollagen-Glykosaminoglykan (GAG)-

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Gerüst, welches mit Glutaraldehyd quervernetzt ist, während anmeldungsgemäß die athrombogene Oberflächenschicht von Blutzellen und Mesothelzellen auf/in der Materialoberfläche von Werkstoffen z.B. mittels Glutaraldehyd fixiert wird.

4. Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 14 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.

Punkt III:

5. Die Ansprüche 14 beziehen sich auf einen Gegenstand, der nach Auffassung dieser Behörde unter die Regel 67.1 (iv) PCT fällt. Daher wird über die gewerbliche Anwendbarkeit des Gegenstands dieser Ansprüche kein Gutachten erstellt (Artikel 34(4) a) (i) PCT).

Punkt VIII:

6. Anspruch 1 erscheint als vage, weil die Bestandteile der äußeren Schicht von Blut/Mesothelzellen nicht definiert sind.

Letztere Bestandteile werden als essentielles technisches Merkmal der Erfindung angesehen, welche im unabhängigen Anspruch angeführt werden sollten (siehe Ansprüche 4-6).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

7. Bezüglich Anspruch 9 ist anzumerken, daß in Beispiel 4 der Anmeldung im Gegensatz zu Anspruch 9 die Isolierung von Chondroitinsulfat direkt aus Rindernieren d.h. aus dem Gesamtorgan erfolgt, ebenso wie in Dokument D1 (Spalte 2, Zeile 62: Kollagen aus Rinderhaut).

Beispiel 4 wäre demnach zu streichen, wie vom Anmelder konzidiert, um Einklang zwischen Beschreibung und Ansprüchen herzustellen.

**THIS PAGE BLANK (USPIC)**

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

|   |           |   |
|---|-----------|---|
| <b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b><br><b>A61L 33/00</b>   | <b>A2</b> | <b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/50106</b><br><b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 31. August 2000 (31.08.00)   |
| <b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP00/01497<br><b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 24. Februar 2000 (24.02.00)<br><b>(30) Prioritätsdaten:</b><br>199 08 318.5      26. Februar 1999 (26.02.99)      DE<br><b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> HOFFMANN, Michael<br>[DE/DE]; Am Widtmanschacht 26, D-52224 Stolberg<br>(DE). HORRES, Roland [DE/DE]; Bergrather Strasse 13,<br>D-52249 Eschweiler (DE).<br><b>(74) Anwalt:</b> FITZNER, Uwe; Lintorfer Strasse 10, D-40878<br>Ratingen (DE).  |           | <b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).<br><br><b>Veröffentlicht .</b><br><i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i> |
| <b>(54) Title:</b> HEMOCOMPATIBLE SURFACES AND METHOD FOR PRODUCING SAME<br><b>(54) Bezeichnung:</b> HÄMOKOMPATIBLE OBERFLÄCHEN UND VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG<br><b>(57) Abstract</b><br><p>The invention relates to hemocompatible surfaces, characterized in that they contain materials and that components of the outer layer of blood cells and/or mesothelial cells are deposited on and/or introduced into the surface of said materials. The invention also relates to a method for preparing hemocompatible surfaces and to their use in numerous areas of the health sector, such as medicine, dentistry, surgery, cosmetics or in fields relating to blood, tissue and/or other body fluids.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b><br><p>Die vorliegende Erfindung betrifft hämokompatible Oberflächen, die sich dadurch auszeichnen, daß sie Werkstoffe enthalten und auf und/oder in die Oberfläche dieser Werkstoffe Bestandteile der äußeren Schicht von Blutzellen und/oder Mesothelzellen auf- und/oder eingebracht sind. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung hämokompatibler Oberflächen sowie deren Verwendung in weiten Bereichen des Gesundheitssektors, in der Medizin, Zahnmedizin, Chirurgie, Kosmetik oder in Bereichen, die mit Blut, Gewebe und/oder anderen Körperflüssigkeiten in Kontakt stehen.</p> |           |   |

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                              |    |                             |    |                             |    |                        |
|----|------------------------------|----|-----------------------------|----|-----------------------------|----|------------------------|
| AL | Albanien                     | ES | Spanien                     | LS | Lesotho                     | SI | Slowenien              |
| AM | Armenien                     | FI | Finnland                    | LT | Litauen                     | SK | Slowakei               |
| AT | Österreich                   | FR | Frankreich                  | LU | Luxemburg                   | SN | Senegal                |
| AU | Australien                   | GA | Gabun                       | LV | Lettland                    | SZ | Swasiland              |
| AZ | Aserbaidshan                 | GB | Vereinigtes Königreich      | MC | Monaco                      | TD | Tschad                 |
| BA | Bosnien-Herzegowina          | GE | Georgien                    | MD | Republik Moldau             | TG | Togo                   |
| BB | Barbados                     | GH | Ghana                       | MG | Madagaskar                  | TJ | Tadschikistan          |
| BE | Belgien                      | GN | Guinea                      | MK | Die ehemalige jugoslawische | TM | Turkmenistan           |
| BF | Burkina Faso                 | GR | Griechenland                |    | Republik Mazedonien         | TR | Türkei                 |
| BG | Bulgarien                    | HU | Ungarn                      | ML | Mali                        | TT | Trinidad und Tobago    |
| BJ | Benin                        | IE | Irland                      | MN | Mongolei                    | UA | Ukraine                |
| BR | Brasilien                    | IL | Israel                      | MR | Mauretanien                 | UG | Uganda                 |
| BY | Belarus                      | IS | Island                      | MW | Malawi                      | US | Vereinigte Staaten von |
| CA | Kanada                       | IT | Italien                     | MX | Mexiko                      |    | Amerika                |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan                       | NE | Niger                       | UZ | Usbekistan             |
| CG | Kongo                        | KE | Kenia                       | NL | Niederlande                 | VN | Vietnam                |
| CH | Schweiz                      | KG | Kirgisistan                 | NO | Norwegen                    | YU | Jugoslawien            |
| CI | Côte d'Ivoire                | KP | Demokratische Volksrepublik | NZ | Neuseeland                  | ZW | Zimbabwe               |
| CM | Kamerun                      |    | Korea                       | PL | Polen                       |    |                        |
| CN | China                        | KR | Republik Korea              | PT | Portugal                    |    |                        |
| CU | Kuba                         | KZ | Kasachstan                  | RO | Rumänien                    |    |                        |
| CZ | Tschechische Republik        | LC | St. Lucia                   | RU | Russische Föderation        |    |                        |
| DE | Deutschland                  | LI | Liechtenstein               | SD | Sudan                       |    |                        |
| DK | Dänemark                     | LK | Sri Lanka                   | SE | Schweden                    |    |                        |
| EE | Estland                      | LR | Liberia                     | SG | Singapur                    |    |                        |



### **Hämokompatible Oberflächen und Verfahren zu deren Herstellung**

Die vorliegende Erfindung betrifft hämokompatible Oberflächen, die sich dadurch auszeichnen, daß auf- und/oder in die Oberfläche von  
5 Werkstoffen Bestandteile der äußeren Schicht von Blutzellen und/oder Mesothelzellen auf- und/oder eingebracht sind. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung hämokompatibler Oberflächen sowie deren Verwendung in weiten Bereichen des Gesundheitssektors, in der Medizin, Zahnmedizin, Chirurgie, Kosmetik  
10 und/oder in Bereichen, die direkt mit Blut, Gewebe und/oder anderen Körperflüssigkeiten in Kontakt stehen.

Die Blutgerinnung stellt sich bei Vertebraten als ein komplexer Prozeß dar,  
15 der im Falle einer Verletzung kurzfristig vor lebensbedrohlichen Blutverlusten schützt. Aktiviert wird das Blutgerinnungssystem dabei u.a. durch den Kontakt mit unphysiologischen, also „körperfremden“ Substanzen. Substanzen, die das Blutgerinnungssystem aktiv unterdrücken, werden auch als anti-thrombogen bezeichnet. Hingegen  
20 werden Substanzen, die das Blutgerinnungssystem gar nicht erst aktivieren als nicht-thrombogen definiert.

Die Aktivierung des Blutgerinnungssystems stellt vor allem bei invasiven Eingriffen ein schwerwiegendes Problem für den Patienten dar. Dies ist  
25 insbesondere für diejenigen Menschen der Fall, die auf Implantate, wie beispielsweise Intracoronarstents, Herzklappen, Prothesen, künstliche Gefäßsysteme, Dialysatoren oder Oxygenatoren, Katheter, Biosensoren u.a. angewiesen sind. Auch der Kontakt mit chirurgischen Nahtmaterialien kann zu Problemen führen.

30 Bislang wird zur Vermeidung der Ausbildung lebensbedrohlicher Gefäßverschlüsse (Thromben) das Blutgerinnungssystem außer Kraft

gesetzt oder aktiv unterdrückt. Dies erfolgt in der Regel durch die Gabe von anti-thrombogenen Medikamenten, sogenannten Antikoagulantien. Diese wiederum weisen eine Vielzahl starker Nebenwirkungen für den Patienten auf, wie beispielsweise Thrombozytopenie, Nausea, Erbrechen, Haarausfall, hämorrhagische Hautnekrosen, erhöhte Blutungsneigung etc.. Darüber hinaus ist im Falle der Verwendung von Intracoronarstents oder Herzklappen selbst die vollständige medikamentöse Unterdrückung der Blutgerinnung oftmals kein ausreichender Schutz vor der Ausbildung zum Teil tödlich wirkender Thrombosen.

10

Für weite Bereiche des Gesundheitssektors, der Medizin, Zahnmedizin, Chirurgie, Kosmetik oder im allgemeinen der Bereiche, die bei invasiven Eingriffen mit Blut und/oder anderen Körperflüssigkeiten in Kontakt stehen, ist daher die Vermeidung der zuvor genannten starken Nebenwirkungen durch Antikoagulantien von großer Bedeutung.

15

Aus dem Stand der Technik sind verschiedene Verfahren bekannt, die unphysiologische „Fremdoberflächen“ durch Beschichtung mit unterschiedlichen Substanzen blut- bzw. gewebeverträglicher (hämkompatibel) machen sollen.

20

So beschreibt die DE 28 31 360 ein Verfahren zur Beschichtung einer Oberfläche eines medizinischen Gegenstandes mit einer Substanz (Heparin), die das Gerinnungssystem aktiv unterdrückt, also anti-thrombogen ist. Jedoch weist diese Substanz den Nachteil erheblicher Nebenwirkungen für den Patienten auf, wie sie beispielhaft bereits zuvor aufgezählt wurden.

25

In der DE 44 35 653 werden Materialien mit einer dünnen Lackschicht aus Polymeren, in die zusätzlich Arzneistoffe eingearbeitet sein können, beschichtet, wobei diese Lackschicht im Körper permanent degradiert und

30

somit freigesetzt wird. Nachteile dieser Methode sind zum einen, daß durch den permanenten Zerfall der Beschichtung nur eine zeitlich begrenzte Wirkung möglich ist. Zum anderen ist durch die permanente Ablösung von Lackpartikeln die Gefahr der Ausbildung von Thrombosen, die zu Embolien führen können, sehr hoch.

Die DE 196 30 879 verwendet zur Beschichtung von Substraten ausschließlich chemisch modifizierte Derivate von Polysacchariden. Die Nachteile dieses Verfahrens sind dabei vielgestaltig und reichen von einem übermäßigen präparativen Aufwand über vielstufige Syntheseschritte, einem breiten Spektrum an unerwünschten Nebenreaktionen und mangelhaften Ausbeuten bis hin zu durchweg schlechteren Eigenschaften der Derivate verglichen mit kommerziell erhältlichen anti-thrombogenen Substanzen, wie beispielsweise Heparin.

Verhagen et al. (British Journal of Haematology, 1996, 95: 542-549) beschreibt die Verwendung von ganzen lebenden Zellen des Endothels bzw. Mesothels zur Besiedlung von Implantaten. Nachteilig an der Verwendung ganzer Zellen ist hier, daß es aufgrund spezifischer Zelloberflächenproteine zu Immunreaktionen kommt, die bei den Patienten zu Abstoßungsreaktionen gegenüber den beschichteten Implantaten führen. Substanzen, die eine solche Immunreaktion auslösen, werden auch als immunogen bezeichnet. Zur Vermeidung einer Abstoßung durch Immunreaktionen muß bei diesem Verfahren ausschließlich Patienteneigenes Zellmaterial benutzt werden. Dies stellt einen weiteren Nachteil dar, da die Anzucht dieser Zellen sehr zeit- und kostenintensiv ist. Problematisch sind bei der Verwendung von ganzen Zellen ferner die hohen Scherkräfte, denen diese Zellen im Blutstrom ausgesetzt sind. Dies führt zu verstärkter Degradation der Zellen an den Oberflächen, was sich negativ auf die Haltbarkeit der beschichteten Implantate auswirkt.

Auch die WO 93/01843, WO 95/29712 und DE 195 05 070 beschreiben die Verwendung von ganzen lebenden Endothelzellen zur Beschichtung von unphysiologischen Materialien bzw. die Verwendung von Substanzen, die ein Anwachsen von lebenden Endothelzellen auf künstlichen Materialien begünstigen. Jedoch liegt auch hier allen Verfahren die Kultivierung lebender Endothelzellen zugrunde, verbunden mit den zuvor bereits beschriebenen Nachteilen hinsichtlich des Zeit- und Kostenaufwandes bzw. der erheblichen Einschränkung, daß das beschichtete Material nicht universell eingesetzt werden kann, sondern für jeden einzelnen Patienten gesondert hergestellt werden muß.

Aus der Patentschrift DE 36 39 561 ist die Herstellung von Substraten, die mit dem spezifischen Endothelzelloberflächen-Proteopolysaccharid HS-I beschichtet werden, bekannt. Nachteile dieses Verfahrens sind, daß auch hier zur Isolierung dieser Komponenten größere Mengen an Patienteneigenen Endothelzellen benötigt werden. Dies erfordert für jeden einzelnen Patienten eine zeit- und kostenintensive Kultivierung seiner körpereigenen Endothelzellen, an die sich zusätzlich eine aufwendige Präparation des Proteopolysaccharid HS-I anschließt. Aufgrund dessen ist eine großtechnische Herstellung von HS-I und somit eine wirtschaftliche Nutzung dieses Verfahrens zur Beschichtung von Implantaten nicht realisierbar.

Die hier vorliegende Erfindung hat sich demgemäß die Aufgabe gestellt, blut- bzw. gewebeverträgliche, also hämokompatible Oberflächen zur Verfügung zu stellen, die die zuvor genannten Nachteile nicht aufweisen und gleichzeitig für eine Herstellung im großtechnischen Maßstab geeignet sind.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch hämokompatible Oberflächen gelöst, die sich dadurch auszeichnen, daß sie als Werkstoffe künstliche und/oder natürliche organische und/oder anorganische Verbindungen und/oder Mischungen davon und/oder Materialien, die bei invasiven Eingriffen mit Blut und/oder anderen Körperflüssigkeiten in Kontakt kommen und/oder tierische Organe und/oder Organteile enthalten und auf und/oder in die Oberfläche dieser Werkstoffe Bestandteile der äußeren Schicht von Blutzellen und/oder Mesothelzellen auf- und/oder eingebracht sind.

10

Die erfindungsgemäß hämokompatiblen Oberflächen ahmen somit im wesentlichen die äußere Oberfläche von Blut- und/oder Mesothelzellen nach, gleichbedeutend mit der Imitation der natürlichen Oberfläche nicht-thromogener Zellen und/oder Gewebe.

15 Das Blutgerinnungssystem wird folglich durch die hämokompatiblen Oberflächen weder aktiviert noch aktiv unterdrückt. Folglich kann eine Blutgerinnung, die z.B. durch sekundäre Verletzungen (Schnittwunden o.ä.) ausgelöst wird, vollkommen natürlich und ungestört ablaufen.

Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, daß eine Anhaftung von Zellen, wie beispielsweise Thrombocyten auf den erfindungsgemäß hämokompatiblen Oberflächen ausbleibt. Dies ist erfindungsgemäß erwünscht, da dadurch das Risiko der Ausbildung von Thromben, d.h. die Gefahr einer Thrombose (Embolie) für den behandelten Patienten minimiert ist. Die erfindungsgemäß hämokompatiblen Oberflächen sind frei von Nebenwirkungen.

Erfindungsgemäß zeichnen sich die hämokompatiblen Oberflächen ferner dadurch aus, daß sie langfristig nicht-thrombogen sind. D.h. ihre vorteilhaften Eigenschaften verbrauchen sich nicht im Laufe der Zeit, so wie es beispielsweise bei pharmazeutisch aktiven Systemen (z.B. Release-System) der Fall ist. Aufgrund dessen eignen sich die

30

erfindungsgemäßen Oberflächen auch zum Dauereinsatz, so daß zusätzliche Belastungen und Risiken für die Patienten durch wiederholte invasive Eingriffe zur Erneuerung der Implantate minimiert werden.

- 5 Erfindungsgemäß enthalten die hämokompatiblen Oberflächen als Werkstoffe künstliche und/oder natürliche organische und/oder anorganische Verbindungen und/oder Mischungen davon und/oder Materialien, die bei invasiven Eingriffen mit Blut und/oder anderen Körperflüssigkeiten in Kontakt kommen und/oder tierische Organe  
10 und/oder Organteile auf und/oder in deren Oberfläche Bestandteile der äußeren Schicht von Blutzellen und/oder Mesothelzellen auf- und/oder eingebracht sind.

- Unter Werkstoffen sind im Sinne der Erfindung sämtliche Materialien zu  
15 verstehen, die sich erfindungsgemäß dazu eignen mit Zellbestandteilen beaufschlagt zu werden. Ebenso zählen hierzu alle Materialien, die bei invasiven Eingriffen oder im Zuge einer entsprechenden Nachsorge mit Blut und/oder Körperflüssigkeiten in Kontakt kommen können.

- 20 Unter organischen Verbindungen sind beispielsweise synthetisch hergestellte oder natürlich vorkommende hochmolekulare Stoffe und deren Derivate zu verstehen. Beispiele hierfür sind u.a. alle Formen von Kunststoffen, Elastomeren, Silikonen oder Faserstoffen. Hierzu zählen z.B. Polyethylene (PE), Polyvinylchloride (PVC), Polyurethane (PUR),  
25 Polyamide (PA), Phenoplaste (PF), Aminoplaste, Polystyrol, Polyester, Harze, Silikone, Kautschuke, Chemiefaserstoffe, Zellulosefaserstoffe, Zellulosemembranen, Proteinfaserstoffe, Collagene sowie Derivate davon oder Kombinationen davon. Ferner sind auch Mischungen dieser Polymere, sogenannte Polymerblends erfindungsgemäß umfaßt.

In einer besonderen Ausführungsvariante der vorliegenden Erfindung können die erfindungsgemäß hämokompatiblen Oberflächen als Werkstoffe tierische Organe, Organteile oder Gefäßsysteme enthalten. Dies können beispielsweise Herzklappen und/oder Gefäßsysteme sein, wobei sich als Quelle Schweine oder Rinder besonders eignen.

Als Beispiele für anorganische Verbindungen enthalten die erfindungsgemäß hämokompatiblen Oberflächen Metalle, Metalloxide, Legierungen, oder Keramiken, Gläser und/oder Mineralien sowie Derivate davon oder alle denkbaren Kombinationen und/oder Mischungen davon. Erfindungsgemäß sind alle Kombinationsmöglichkeiten von Werkstoffen denkbar. Die Beispiele führen die vorliegende Erfindung näher aus, sind jedoch nicht limitierend.

Erfindungsgemäß sind in und/oder auf der Oberfläche der Werkstoffe Bestandteile der äußeren Schicht von Blutzellen und/oder Mesothelzellen ein- und/oder aufgebracht.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung enthalten die hämokompatiblen Oberflächen in und/oder auf der Oberfläche von Werkstoffen Glykoproteine, bevorzugt Glykophorine. Diese Glykophorine zeichnen sich u.a. durch nicht-thrombogene Eigenschaften aus und eignen sich dadurch hervorragend zur Herstellung erfindungsgemäß hämokompatibler Oberflächen.

Durch die Glykophorine der äußeren Schicht von Erythrocyten ist u.a. die Blutgruppenzugehörigkeit eines Menschen festgelegt. Analog zu den verschiedenen Blutgruppen A, B, AB und 0 enthalten die korrespondierenden Erythrocyten Glykophorin A, Glykophorin B oder Glykophorin 0 oder entsprechende Mischungen davon.

Eine mögliche Immunantwort durch Kreuzreaktionen nicht miteinander verträglicher Blutgruppen, d.h. ein Verklumpen von Blut (Koagulation)

kann hier auf einfache Weise dadurch ausgeschlossen werden, daß vor einem invasiven Eingriff eine Abstimmung erfolgt, hinsichtlich der Blutgruppe des zu behandelnden Patienten und der auf und/oder in die Oberfläche von Werkstoffen auf- und/oder eingebrachten Glykophorine  
5 der zur Applikation beabsichtigten erfindungsgemäß hämokompatiblen Oberflächen. Entsprechende Bluttests sind gängige Laborpraxis und werden entsprechend routinemäßig durchgeführt. Unter der Voraussetzung der Beachtung der Blutgruppenverträglichkeit sind somit auch Glykophorin enthaltende hämokompatible Oberflächen universell  
10 einsetzbar, d.h. nicht an einen einzigen Patienten gebunden.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung hämokompatible Oberflächen enthaltend auf und/oder in der Oberfläche der Werkstoffe Oligosaccharid-, Polysaccharid- und/oder Lipid-Anteile der Glykoproteine, Glykolipide  
15 und/oder Proteoglykane aus der äußeren Schicht von Blutzellen und/oder Mesothelzellen.

In einer weiteren Ausführungsvariante der vorliegenden Erfindung enthalten die hämokompatiblen Oberflächen auf und/oder in der  
20 Oberfläche der Werkstoffe Glykosphingolipide.

Ferner können die hämokompatiblen Oberflächen der vorliegenden Erfindung als Oligosaccharid- oder Polysaccharid-Anteile der Proteoglykane Hyaluronsäuren, Chondroitinsulfate, Dermatansulfate, Heparansulfate, Keratansulfate oder Mischungen davon enthalten. In einer  
25 bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung enthalten die hämokompatiblen Oberflächen Heparansulfat der Erythrocyten-Plasmamembran tierischer und/oder menschlicher Herkunft.



Die erfindungsgemäß hämokompatiblen Oberflächen sind frei von Nebenwirkungen, wie sie z.B. durch chemisch oder pharmazeutisch aktive Beschichtungen bekannt sind.

- 5 Bei den zuvor genannten Bestandteilen der Blut- und/oder Mesothelzellen handelt es sich um nicht-immunogene Zellbestandteile. Folglich zeichnen sich die erfindungsgemäß hämokompatiblen Oberflächen dadurch aus, daß sie außerdem nicht-immunogen sind. Das heißt, sie lösen bei den Patienten keine Immunreaktion aus, wodurch die Gefahr einer Abstoßung  
10 der hämokompatiblen Oberflächen minimiert ist.

Erfindungsgemäß sind die hämokompatiblen Oberflächen nicht-thrombogen und/oder nicht-immunogen.

- 15 Ein weiterer Vorteil ist, daß aufgrund der erfindungsgemäßen festen Verankerung der nicht-thrombogenen Bestandteile der äußeren Schicht der Blut und/oder Mesothelzellen auf den Werkstoffen nahezu keine Degradation an den hämokompatiblen Oberflächen stattfindet. Eine Gefahr der Bildung von Embolien durch Thrombosen ist somit minimiert.
- 20 Ferner erfolgt keine Anlagerung von Zellen, wie z.B. Thrombocyten auf den erfindungsgemäß hämokompatiblen Oberflächen. Dies minimiert ebenfalls die Gefahr von Thrombosen.
- 25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäß hämokompatiblen Oberflächen, bei dem Glykophorine, Oligosaccharid-, Polysaccharid- und/oder Lipid-Anteile der Glykoproteine, Glykolipide und/oder Proteoglykane aus der äußeren Schicht von Blutzellen und/oder Mesothelzellen isoliert werden und diese  
30 Zellbestandteile durch physikalische oder chemische Bindung auf und/oder in die Oberfläche von Werkstoffen aus künstlichen und/oder

natürlichen organischen und/oder anorganischen Verbindungen und/oder Mischungen davon und/oder Materialien, die bei invasiven Eingriffen mit Blut und/oder anderen Körperflüssigkeiten in Kontakt kommen und/oder tierischen Organen und/oder Organteilen auf- und/oder eingebracht  
5 werden.

Erfindungsgemäß werden die Bestandteile der äußeren Schicht von Blutzellen aus Vollblut und/oder aus daraus gewonnenen Zellfraktionen menschlicher oder tierischer Herkunft isoliert. D.h., daß die  
10 Zellbestandteile aus Erythrocyten, Leukocyten und/oder Thrombocyten oder Gemischen davon isoliert werden. Bevorzugt werden Gemische aus Erythrocyten und Leukocyten. Besonders bevorzugt werden Erythrocyten.

Die Bestandteile der äußeren Schicht von Mesothelzellen werden  
15 erfindungsgemäß aus Omentum, Peritoneum und/oder inneren Organen isoliert.

Eine preiswerte und leicht zugängliche Quelle für diese Ausgangsmaterialien können beispielsweise Schlachtabfälle sein.

20

Die Isolierung der Bestandteile der äußeren Schicht der Blutzellen, Mesothelzellen oder des mesothelzellreichen Gewebes erfolgt dabei in an sich bekannter Weise. Beispielsweise sind hier folgende Verfahren oder deren Kombinationen denkbar: Zerkleinerung, Extraktion, Filtration,  
25 Fällung, Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie, Elektrophorese, enzymatische oder chemische Abbauten, Trocknung, Auflösung, Dialyse, Ultrafiltration etc..

Erfindungsgemäß wird zur Auf- und/oder Einbringung der Zellbestandteile  
30 auf und/oder in die Oberfläche der Werkstoffe eine chemische Immobilisierung, Photoimmobilisierung, Adhäsion, Trocknung oder eine

Kombination davon durchgeführt. Dabei können kovalente, ionische, nebenvalente bzw. elektrostatische oder adhäsive Bindungen oder Kombinationen davon zwischen den Bestandteilen der äußeren Schicht der Zellen und den Oberflächen der Werkstoffe ausgebildet werden.

- 5 Bevorzugt erfolgt die Auf- bzw. Einbringung der Bestandteile der äußeren Zellschicht auf/in die Oberfläche von Werkstoffen durch kovalente Bindungen.

10

Ein besonderer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, daß das erfindungsgemäße Herstellungsverfahren enorme wirtschaftliche Verbesserungen gegenüber bisher bekannten Verfahren auf sich vereint und folglich die erfindungsgemäß hämokompatiblen Oberflächen zur

15 Herstellung im großtechnischen Maßstab geeignet sind.

- Dies basiert beispielsweise darauf, daß erfindungsgemäß Zellbestandteile und keine lebenden Zellen eingesetzt werden, daß keine körpereigenen (Endothel-) Zellen des Patienten verwendet werden müssen, daß das Ausgangsmaterial zur Isolierung dieser Zellbestandteile preiswert und in
- 20 großen Mengen verfügbar ist (Schlachtabfälle), daß somit keine Zellkultivierung erforderlich ist, die sehr zeit- und kostenintensiv ist. Ein Vorteil der erfindungsgemäß hämokompatiblen Oberflächen ist ferner, daß sie universell einsetzbar sind und nicht nur an den Einsatz für einen einzigen Patienten gebunden sind. Dies stellt vor allem bei Notoperationen
- 25 einen lebenswichtigen Vorteil für die Patienten dar.

- Die Anwendungsgebiete der vorliegenden Erfindung sind weit gestreut. Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung hämokompatibler Oberflächen in weiten Bereichen des Gesundheitssektors, in der Medizin,
- 30 Zahnmedizin, Chirurgie oder Kosmetik und/oder in Bereichen, die bei

invasiven Eingriffen mit Blut, Gewebe und/oder anderen Körperflüssigkeiten in Verbindung kommen.

- 5 Im folgenden wird die Erfindung unter Bezugnahme auf die Beispiele näher erläutert, die jedoch nicht limitierend sind:

**1.) Isolierung von Erythrocytenplasmamembran Heparansulfat:**

- 10 Ein Liter serumfrei gewaschene Erythrocyten werden in 1 Liter 0,154 molarem Phosphatpuffer pH 7 suspendiert und mit 1 U/ml Papain versetzt. Nach 2 Stunden Inkubation bei 56°C wird 20 Minuten bei 3000 g abzentrifugiert und der Überstand anschließend dekantiert. In diesem Überstand werden 100 ml DEAE-Sepharose CL-6B Ionenaustauscher-Gel
- 15 der Firma Pharmacia Biotech suspendiert. Das so beladene Gel wird noch dreimal in 0,1 molarer Kochsalz-Lösung gewaschen und in eine Chromatographiesäule gefüllt. Die Elution erfolgt mittels eines linearen Kochsalzgradienten im Bereich von 0,1 bis 0,8 mol/l über einem Gesamt-Elutionsvolumen von 2 Litern. Es werden 200 Fraktionen zu je 10 ml
- 20 Volumen gesammelt. Die Fraktionen, die mit Dimethylmethylenblau (DMMB) der Firma Fluka nach der Methode beschrieben bei Chandrasekhar et al (Analytical Biochemistry, 161 (1987): 103-108) eine positive Farbreaktion ergeben, werden vereinigt. Die Lösung der gesammelten Fraktionen wird bei 26,7 hPa (20 Torr) und 40°C eingeeengt und gegen Wasser dialysiert. Das Dialysat wird auf ein Volumen von 100
- 25 ml und eine Konzentration von 0,03 mol/l Natriumacetat, 0,073 mol/l Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan der Firma Fluka) und pH 8.0 eingestellt, mit 1 U Chondroitinase ABC versetzt und 15 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Dialysieren gegen Wasser und Einengen unter Wasserstrahlvakuum
- 30 wird die erhaltene Lösung erneut auf eine Säule mit 100 ml DEAE-Sepharose CL-6B der Firma Pharmacia Biotech. aufgetragen und wie

zuvor beschrieben eluiert. Die DMMB-positiven Gradientenfractionen werden dialysiert, unter Wasserstrahlvakuum auf ein Volumen von 1 ml eingeeengt und auf einer Säule zur präparativen Gelfiltration (60 cm x 2 cm) unter Verwendung eines Sephacryl S-300 Gels (Pharmacia Biotech.) chromatographiert. Es werden 60 Fraktionen zu je 2 ml Volumen gesammelt, mit DMMB detektiert und die positiven Fraktionen vereinigt. Nach wiederholter Dialyse und Lyophilisation erhält man das aufgereinigte Erythrocytenplasmamembran-Heparansulfat.

10

## **2.) Isolierung von Leukocytenoberflächen-Proteochondroitinsulfat:**

Ein Liter Citratblut wird 10 min in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor bei 3000 g zentrifugiert und das überstehende Plasma abgesaugt. Das Zellsediment wird mit 2 Litern auf 4°C gekühlter 1%iger Ammoniumoxalatlösung gemischt und 30 min bei derselben Temperatur inkubiert. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 500 g wird der rote Überstand verworfen und das Pellet in 2 Litern auf 4°C gekühlter 1%iger Ammoniumoxalatlösung suspendiert, 5 min bei 500 g zentrifugiert und der Waschvorgang, wie oben beschrieben noch zweimal wiederholt. Der nun farblose Überstand wird verworfen und das gewaschene Zellsediment (Ausbeute:  $12 \times 10^7$  -  $10 \times 10^9$  Zellen in 2 Litern Triton X-100 Puffer (0,5% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8) unter ständigem Rühren bei 25°C über 2 Stunden lysiert. Der Detergenzextrakt wird 60 min bei 10.000 g zentrifugiert, dekantiert und im Überstand werden im 10 ml DEAE Sephadex A50 Ionenaustauscher Gel der Firma Pharmacia Biotech. suspendiert und sedimentiert. Das so beladene Gel wird noch dreimal in 0,1 molarer Kochsalz-Lösung gewaschen und in eine Chromatographiesäule gefüllt. Mit einem linearen Kochsalzgradienten von 0,1 bis 0,8 mol/l über ein Gesamt-Elutionvolumen von 2 Litern wird die

Säule eluiert. Es werden 100 Fraktionen zu je 2 ml Volumen gesammelt und die Fraktionen, die mit Dimethylmethylenblau (DMMB der Firma Fluka) eine positive Farbreaktion ergeben, vereinigt. Die Lösung wird bei 26,7 hPa (20 Torr) und 40°C eingeeengt und gegen Wasser dialysiert. Das  
5 Dialysat wird auf ein Volumen von 100 ml und eine Konzentration von 0,1 mmol/l Calciumacetat und 0,1 mol/l Natriumacetat eingestellt, mit Essigsäure auf pH 7 titriert, mit je 1 U Heparinase I, Heparinase II und Heparinase III versetzt und 15 Stunden bei 37°C inkubiert.

Nach Dialysieren gegen Wasser und Einengen unter Wasserstrahlvakuum  
10 wird die resultierende Lösung erneut auf eine Säule mit 10 ml DEAE Sephadex A50 der Firma Pharmacia Biotech. aufgetragen und wie oben beschrieben eluiert. Die DMMB-positiven Gradientenfraktionen werden dialysiert, unter Wasserstrahlvakuum auf ein Volumen von 1 ml eingeeengt und auf einer Säule zur präparativen Gelfiltration (60 cm x 2 cm) unter  
15 Verwendung eines Sepharose Cl-4B Gels der Firma Pharmacia Biotech. chromatographiert. Es werden 60 Fraktionen zu je 2 ml Volumen gesammelt, mit DMMB detektiert und die positiven Fraktionen vereinigt. Nach wiederholter Dialyse und Lyophilisation erhält man das aufgereinigte Leukocytenoberflächen-Proteochondroitinsulfat.

20

### **3.) Isolierung von Heparansulfat/Chondroitinsulfat-Gemisch aus Omentum:**

25 Ein Kilogramm frisches Rinderomentum wird mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen, gefriergetrocknet, gemahlen und mit 1 Liter Aceton durch Rühren über Nacht bei Raumtemperatur entfettet. Nach dem Abfiltrieren und Trocknen wird das resultierende Pulver in 6 molarer Harnstoff-Lösung suspendiert und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach  
30 Zentrifugation bei 3000 g für 1 Stunde wird der schleimige Überstand dekantiert, auf 4°C gekühlt, mit dem gleichen Volumen 4°C kalter 1

molarer NaOH gemischt und 15 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wird mit verdünnter HCl neutralisiert, gegen Wasser dialysiert, 1 Stunde bei 3000 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Im Überstand werden 100 ml DEAE-Sepharose CL-6B Ionenaustauscher-Gel der Firma Pharmacia Biotech. suspendiert und sedimentiert. Das so beladene Gel wird noch dreimal in 0,1 molarer Kochsalz-Lösung gewaschen und in eine Chromatographiesäule gefüllt. Mit einem linearen Kochsalzgradienten von 0,1 bis 0,8 mol/l über einem Gesamt-Elutionsvolumen von 2 Litern wird die Säule eluiert. Es werden 200 Fraktionen zu je 10 ml Volumen gesammelt und die Fraktionen, die mit Dimethylmethylenblau (DMMB) eine positive Farbreaktion ergeben, vereinigt. Die Lösung wird bei 26,7 hPa (20 Torr) und 40°C eingeeengt und gegen Wasser dialysiert. Unter Wasserstrahlvakuum wird erneut auf ein Volumen von 5 ml eingeeengt und auf einer Säule zur präparativen Gelfiltration (60 cm x 5 cm) unter Verwendung eines Sephacryl S-300 Gels der Firma Pharmacia Biotech. chromatographiert. Es werden 60 Fraktionen zu je 10 ml Volumen gesammelt, mit DMMB detektiert und die positiven Fraktionen vereinigt. Nach wiederholter Dialyse und Lyophilisation erhält man das aufgereinigte Mesothelzelloberflächen-Glykosaminoglykan-Gemisch.

20

#### **4.) Isolierung von Mesothelzelloberflächen Chondroitinsulfat aus mesothelzellreichen Geweben:**

Ein Kilogramm frische Rindernieren wird mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen, gefriergetrocknet, gemahlen und mit 1 Liter Aceton durch Rühren über Nacht bei Raumtemperatur entfettet. Nach dem Abfiltrieren und Trocknen wird das resultierende Pulver in 4 molarer Guanidiniumchlorid-Lösung suspendiert und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zentrifugation bei 3000 g für 1 Stunde wird der schleimige Überstand abgegossen, auf 4°C gekühlt, mit dem gleichen

30

Volumen 4°C kalter 1 molarer NaOH gemischt und 15 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wird mit verdünnter HCl neutralisiert, gegen Wasser dialysiert, 1 Stunde bei 3000 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Im Überstand werden 100 ml DEAE-Sephacel Ionenaustauscher-Gel suspendiert und sedimentiert. Das so beladene Gel wird noch dreimal in 0,1 molarer Kochsalz-Lösung gewaschen und in eine Chromatographiesäule gefüllt. Mit einem linearen Kochsalzgradienten von 0,1 bis 0,8 mol/l über einem Gesamt-Elutionsvolumen von 2 Litern wird die Säule eluiert. Es werden 200 Fraktionen zu je 10 ml Volumen gesammelt und die Fraktionen, die mit DMMB eine positive Farbreaktion ergeben, vereinigt. Die Lösung wird bei 26,7 hPa (20 Torr) und 40°C eingeeengt und gegen Wasser dialysiert. Das Dialysat wird auf ein Volumen von 100 ml und eine Konzentration von 0,1 mmol/l Calciumacetat und 0,1 mol/l Natriumacetat eingestellt, mit Essigsäure auf pH 7 titriert, mit je 1 U Heparinase I, Heparinase II und Heparinase III versetzt und 15 Stunden bei 37°C inkubiert.

Nach Dialysieren gegen Wasser und Einengen unter Wasserstrahlvakuum wird die resultierende Lösung erneut auf eine Säule mit 10 ml DEAE-Sephacel aufgetragen und wie oben beschrieben eluiert. Die DMMB-positiven Gradientenfraktionen werden analysiert, unter Wasserstrahlvakuum auf ein Volumen von 1 ml eingeeengt und auf einer Säule zur präparativen Gelfiltration (60 cm x 5 cm) unter Verwendung eines Sephacryl S-300 Gels chromatographiert. Es werden 60 Fraktionen zu je 10 ml Volumen gesammelt, mit DMMB detektiert und die positiven Fraktionen vereinigt. Nach wiederholter Dialyse und Lyophilisation erhält man das aufgereinigte Mesothelzelloberflächen-Chondroitinsulfat.

5.) Immobilisierung von Mesothelzelloberflächen  
Chondroitinsulfat mit (N-Cyclohexyl-N'-2-



**morpholinoethyl)carbodiimidmethyl p-Toluolsulfonat (CME-CDI) auf funktionalisierte Zelluloseoberflächen:**

100 mg Zellulosemembran werden in eine 2 prozentige Lösung von 3-  
5 Aminopropyl-triethoxysilan in Ethanol/Wasser (50:50) gegeben und 24  
Stunden bei 45°C gerührt. Danach werden die Membranen mit viel  
Wasser gewaschen und getrocknet. Die so behandelten Membranen  
werden in eine Lösung von 1 mg Mesothelzelloberflächen  
Chondroitinsulfat in 80 ml 0,1 molarer 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-  
10 Puffer pH 4,75 getaucht. Über einen Zeitraum von 6 Stunden werden bei  
4°C 200 mg (N-Cyclohexyl-N'-2-morpholinoethyl)carbodiimidmethyl p-  
Toluolsulfonat (CME-CDI) der Firma Sigma in 10 mg Portionen zugegeben  
und über Nacht bei 4°C weitergerührt. Danach wird 2 Stunden in 4 molarer  
NaCl-Lösung gerührt, mit viel Wasser gespült und an der Luft getrocknet.

15

**6.) CNCI Immobilisierung von Sphingoglycolipid auf Glas:**

Ein Glas, beispielsweise ein Deckgläschen für die Mikroskopie, wird 6  
20 Stunden in 5 ml Chromschwefelsäure gerührt. Dann wird mit viel Wasser  
gewaschen, luftgetrocknet und in 15 ml Dioxan auf 50°C erhitzt.  
Anschließend werden 2,5 ml einer 2 molaren N,N'-Diisopropylethylamin-  
Lösung in Dioxan zugegeben und 30 min gerührt. Dann werden 2,5 ml  
einer 1 molaren CNCI-Lösung in Dioxan zugeführt und für weitere 2  
25 Stunden gerührt. Anschließend wird zuerst mit Dioxan gewaschen, dann  
mit Dioxan/Wasser und schließlich mit reinem Wasser gewaschen. Das so  
modifizierte Glas wird in 20 ml einer Lösung aus 1 mol/l Ethylendiamin und  
0,1 mol/l NaHCO<sub>3</sub> gegeben, dann auf 50°C erwärmt und 72 Stunden bei  
dieser Temperatur gerührt. Anschließend werden 0,1 mg  
30 Sphingoglycolipid aus humanen Erythrocyten in 20 ml 0,1 molarer  
NaHCO<sub>3</sub> gelöst und zusammen mit dem substituierten Glas 110 Stunden

bei 60°C gerührt. Dann werden 2,5 ml Ethanolamin hinzu gegeben und weitere 30 Minuten gerührt. Das beschichtete Glas wird mit 4 molarer NaCl-Lösung und anschließend mit viel Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet.

5

**7.) Immobilisierung von Erythrocytenplasmamembran-Heparansulfat auf die Oxidschicht von Nickel, Titan, Aluminium oder ähnlichen Metallen:**

10

Das Metallwerkstück wird vier Stunden im Ultraschallbad mit heißem Wasser gereinigt, mit Aceton gewaschen und eine Stunde in einem Soxhlet-Extraktor mit Chloroform entfettet. Das so gereinigte Werkstück wird getrocknet und 2-15 min unter Rühren in eine 0,01 -0,1 molare Lösung von  $\omega$ -Hexadecenyltrichlorsilan in Bicyclohexyl getaucht, zweimal mit Chloroform und Wasser gewaschen und 15 min im Soxhlet-Extraktor mit Chloroform extrahiert. Das Werkstück wird bei 0°C 45 min in eine Lösung von 2 ml Aceton und 100 mg  $\text{KMnO}_4$  in 18 ml Wasser getaucht und durch die einen  $\text{CO}_2$ -Strom geleitet. Danach wird es für 15 Sekunden in eine 20%ige Lösung von Natriumbisulfit in Wasser getaucht, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

20

Das Werkstück wird über Nacht in einer Lösung von 29,25 g Paratoluylsulfonylchlorid in 900 ml Aceton und 180 ml Pyridin bei 40°C gerührt. Anschließend wird das Werkstück mit Wasser und Methanol gewaschen und 40 Stunden lang bei 60°C in einer Lösung von 1 mmol/l Diaminododekan in 1 Liter Dimethylformamid gerührt. Danach wird das Werkstück sukzessive mit Wasser, 1 mol/l Sodalösung, 1 mmol/l Salzsäure und Wasser gewaschen. Das so vorbereitete Werkstück wird für 90 Minuten in einer Borat-Pufferlösung (Natriumtetraborat 0,065 mol/l, pH 9,5) gerührt. Schließlich wird in einer Lösung aus 0,3 g 4-Azido-1-Fluoro-2-Nitrobenzol in einem Liter Ethanol über Nacht bei 37°C gerührt.

30

0,5 g Erythrocytenplasmamembran-Heparansulfat werden in einem Liter 0,1 molaren 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-(MES)-Puffer pH 4,75 gelöst und mit dem Werkstück bei 4°C für 48 Stunden gerührt. Das Erythrocytenplasmamembran-Heparansulfat wird kovalent immobilisiert 10  
5 minütige Belichtung mit einer Hochdruck-Quecksilberlampe. Nach Waschen mit 4 molarer Kochsalzlösung für 40 Minuten wird das Werkstück mit Wasser gewaschen und anschließend getrocknet.

10 **8.) Photochemische Immobilisierung von Leukocytenplasmamembran-Chondroitinsulfat auf Zellulose:**

3 g Zellulosemembran werden in 4 molarer NaOH 2 Stunden quellen gelassen, dreimal mit Wasser gewaschen, einmal mit Wasser/Aceton und  
15 einmal mit Aceton gewaschen. Die so aktivierte Zellulose wird über Nacht in einer Lösung von 29,25 g Paratoluylsulfonylchlorid in 900 ml Aceton und 180 ml Pyridin bei 40°C gerührt. Anschließend wird die Zellulosemembran mit Wasser und Methanol gewaschen. Die resultierende veresterte Zellulosemembran wird nun über 40 Stunden bei  
20 60°C in einer Lösung von 1 mmol/l Diaminododekan in 1 Liter Dimethylformamid gerührt. Danach wird die Membran sukzessive mit Wasser, 1 mol/l Sodalösung, 1 mmol/l Salzsäure und Wasser gewaschen. Die so erhaltene Aminozellulose wird für 90 Minuten in einer Borat-Pufferlösung (Natriumtetraborat 0,065 molar, pH 9,5) gerührt. Schließlich  
25 wird die Membran in einer Lösung aus 0,3 g 4-Azido-1-Fluoro-2-Nitrobenzol in einem Liter Ethanol über Nacht bei 37°C gerührt. 0,5 g Leukocytenoberflächen-Chondroitinsulfat werden in einem Liter 0,1 molaren 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-Puffer pH 4,75 gelöst und mit  
30 2,5 g der wie oben beschrieben hergestellten Azido-Zellulose bei 4°C für 48 Stunden gerührt. Das Leukocytenoberflächen-Chondroitinsulfat wird kovalent immobilisiert durch 10 minütige Belichtung mit einer Hochdruck-

Quecksilberlampe. Nach Waschen mit 4 molarer Kochsalzlösung für 40 Minuten und Wasser wird die Zellulosemembran getrocknet.

5    **9.) Immobilisierung von Glycophorin A mit Glutardialdehyd auf Silikon:**

1 g Silikonfolie wird mit 20 ml Wasser und 2 ml 3-Aminopropyltriethoxysilan versetzt und der pH-Wert auf 3,5 eingestellt.  
10 Dann wird für 2 Stunden auf 75°C erhitzt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Das so erhaltene Aminogruppen-haltige Silikon wird mit einer 2,5 prozentigen Lösung von Glutardialdehyd in 0,05 molarem Natriumphosphatpuffer versetzt und auf pH 7 eingestellt. Nach 60 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wird das so hergestellte aktivierte Silikon mit  
15 einer 0,1%igen Lösung von Glycophorin A (Sigma) unter Rühren 2-4 Stunden umgesetzt und mit Wasser gewaschen.

**10.) Immobilisierung von Erythrocytenplasmamembran-Heparansulfat auf Polyvinylchlorid (PVC):**

20 0,5 g Eisen-II-sulfat, 100 µl konzentrierte Schwefelsäure und 2 ml Methacrylsäure werden in 250 ml Wasser gelöst. Zu dieser Lösung werden 125 mg Natriumdisulfit sowie 125 mg Kaliumperoxodisulfat zugegeben. Anschließend wird diese Lösung zwei Stunden bei  
25 Raumtemperatur durch einen ringförmigen 1 m langen PVC-Schlauch von 3 mm Innendurchmesser gepumpt. Die dabei ablaufende Pfropfpolymerisation wird durch Zugabe von 100 mg Hydrochinon abgebrochen. Dann wird der Schlauch gründlich mit Wasser gewaschen. Eine auf 4°C gekühlte Lösung von 250 mg CME-CDI (N-Cyclohexyl-N'-2-morpholinoethyl)carbodiimidmethyl p-Toluolsulfonat in 250 ml 0,1 molarem  
30 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-Puffer pH 4,75 wird bei 4°C 30 min im

Kreis durch den Schlauch gepumpt. Der so aktivierte Schlauch wird mit 0,1 molarem 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-Puffer pH 4,75 gewaschen. Dann wird eine Lösung von 1 mg Erythrocytenplasmamembran-Heparansulfat in 0,1 molarem 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-Puffer pH 4,75 bei 4°C 15 Stunden lang im Kreis durch den Schlauch gepumpt. Abschließend wird der Schlauch mit 4 molarer Kochsalzlösung und dann mit Wasser gespült.

**Patentansprüche 1-14:**

1. Hämkompatible Oberflächen, dadurch gekennzeichnet, daß sie als  
Werkstoffe künstliche und/oder natürliche organische und/oder  
5 anorganische Verbindungen und/oder Mischungen davon und/oder  
Materialien, die bei invasiven Eingriffen mit Blut und/oder anderen  
Körperflüssigkeiten in Kontakt kommen und/oder tierische Organe  
und/oder Organteile enthalten und auf und/oder in die Oberfläche  
dieser Werkstoffe Bestandteile der äußeren Schicht von Blutzellen  
10 und/oder Mesothelzellen auf- und/oder eingebracht sind.
2. Hämkompatible Oberflächen nach Anspruch 1, dadurch  
gekennzeichnet, daß sie nicht-thrombogen und/oder nicht-immunogen  
sind.  
15
3. Hämkompatible Oberflächen nach einem der Ansprüche 1 oder 2  
enthaltend auf und/oder in der Oberfläche der Werkstoffe  
Glykophorine.
- 20 4. Hämkompatible Oberflächen nach einem der Ansprüche 1-3  
enthaltend auf und/oder in der Oberfläche der Werkstoffe  
Oligosaccharid-, Polysaccharid- und/oder Lipid-Anteile der  
Glykoproteine, Glykolipide und/oder Proteoglykane aus der äußeren  
Schicht von Blutzellen und/oder Mesothelzellen.  
25
5. Hämkompatible Oberflächen nach einem der Ansprüche 1-4  
enthaltend auf und/oder in der Oberfläche der Werkstoffe  
Glykosphingolipide.
- 30 6. Hämkompatible Oberflächen nach einem der Ansprüche 1-5  
enthaltend auf und/oder in der Oberfläche der Werkstoffe als

Oligosaccharid- und/oder Polysaccharid-Anteile der Proteoglykane Hyaluronsäuren, Chondroitinsulfate, Dermatansulfate, Heparansulfate, Keratansulfate oder Mischungen davon.

- 5 7. Hämkompatible Oberflächen nach einem der Ansprüche 1-6 enthaltend auf und/oder in der Oberfläche der Werkstoffe Heparansulfat der Erythrocyten-Plasmamembran tierischer und/oder menschlicher Herkunft.
- 10 8. Hämkompatible Oberflächen nach einem der Ansprüche 1-7 enthaltend als Werkstoffe hochmolekulare organische Verbindungen und/oder Metalle, Metalloxide, Legierungen, Keramiken, Gläser, Mineralien und/oder Mischungen der zuvor genannten Werkstoffe.
- 15 9. Verfahren zur Herstellung hämkompatibler Oberflächen, dadurch gekennzeichnet, daß
- a) Glykophorine und/oder Oligosaccharid-, Polysaccharid- und/oder Lipid-Anteile der Glykoproteine, Glykolipide und/oder Proteoglykane aus der äußeren Schicht von Blutzellen und/oder
- 20 Mesothelzellen isoliert werden und
- b) diese Zellbestandteile durch physikalische oder chemische Bindung auf und/oder in die Oberfläche von Werkstoffen aus künstlichen und/oder natürlichen organischen und/oder anorganischen Verbindungen und/oder Mischungen davon und/oder Materialien,
- 25 die bei invasiven Eingriffen mit Blut und/oder anderen Körperflüssigkeiten in Kontakt kommen und/oder tierischen Organen und/oder Organteilen auf- und/oder eingebracht werden.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die
- 30 Bestandteile der äußeren Schicht von Blutzellen aus Vollblut und/oder

aus daraus gewonnenen Zellfraktionen menschlicher oder tierischer Herkunft isoliert werden.

- 5 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß Zellbestandteile aus Erythrocyten, Leukocyten und/oder Thrombocyten und/oder Gemischen davon isoliert werden.
- 10 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9-11, dadurch gekennzeichnet, daß Bestandteile der äußeren Schicht von Mesothelzellen aus Omentum, Peritoneum und/oder inneren Organen isoliert werden.
- 15 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9-12, dadurch gekennzeichnet, daß zur Auf- und/oder Einbringung der Zellbestandteile auf und/oder in die Oberfläche der Werkstoffe eine chemische Immobilisierung, Photoimmobilisierung, Adhäsion, Trocknung oder eine Kombination davon durchgeführt wird.
- 20 14. Verwendung hämokompatibler Oberflächen gemäß einem der Ansprüche 1-8 in weiten Bereichen des Gesundheitssektors, in der Medizin, Zahnmedizin, Chirurgie oder Kosmetik und/oder in Bereichen, die bei invasiven Eingriffen mit Blut, Gewebe und/oder anderen Körperflüssigkeiten in Verbindung kommen.



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
31. August 2000 (31.08.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 00/50106 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: A61L 33/18

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/01497

(22) Internationales Anmeldedatum:  
24. Februar 2000 (24.02.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 08 318.5 26. Februar 1999 (26.02.1999) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: HOFFMANN, Michael [DE/DE]; Bergrather  
Strasse 13, D-52249 Eschweiler (DE). HORRES, Roland  
[DE/DE]; Am Dorfweiher 1, D-52223 Stolberg (DE).

(74) Anwalt: FITZNER, Uwe; Lintorfer Strasse 10, D-40878  
Ratingen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,

DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,  
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,  
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,  
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasis-  
ches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen  
Recherchenberichts: 26. April 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: HEMOCOMPATIBLE SURFACES AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) Bezeichnung: HÄMOKOMPATIBLE OBERFLÄCHEN UND VERFAHREN ZU DEREN HERSTELLUNG

(57) Abstract: The invention relates to hemocompatible surfaces, characterized in that they contain materials and that components of the outer layer of blood cells and/or mesothelial cells are deposited on and/or introduced into the surface of said materials. The invention also relates to a method for preparing hemocompatible surfaces and to their use in numerous areas of the health sector, such as medicine, dentistry, surgery, cosmetics or in fields relating to blood, tissue and/or other body fluids.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft hämokompatible Oberflächen, die sich dadurch auszeichnen, daß sie Werkstoffe enthalten und auf und/oder in die Oberfläche dieser Werkstoffe Bestandteile der äußeren Schicht von Blutzellen und/oder Mesothelzellen auf- und/oder eingebracht sind. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung hämokompatibler Oberflächen sowie deren Verwendung in weiten Bereichen des Gesundheitssektors, in der Medizin, Zahnmedizin, Chirurgie, Kosmetik oder in Bereichen, die mit Blut, Gewebe und/oder anderen Körperflüssigkeiten in Kontakt stehen.

WO 00/50106 A3

**THIS PAGE BLANK (USP16)**